UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE ESTUDIO DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

"Efecto de la concentración de aceite esencial de oregano (*Origanum vulgare*) sobre la cepa de *staphylococcus aureus* en queso mantecoso"

Área de Investigación:
Microbiología alimentaria

Autor(es):
Br. Valverde Deza, Ana Cecilia

Jurado Evaluador:

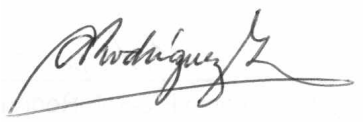
Presidente: Dr. Rodríguez Zevallos, Antonio Ricardo
Secretario: Ms. Márquez Villacorta, Luis Francisco
Vocal: Dra. Urraca Vergara, Elena Matilde.

Asesor:
Dra. Mejía Delgado, Elva Manuela
Código Orcid: 0000-0002-0296-2695

TRUJILLO – PERÚ
2022

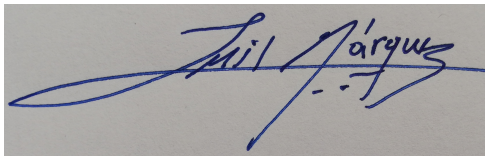
Fecha de sustentación: 2008/02/08

La presente tesis ha sido aprobada por el siguiente Jurado



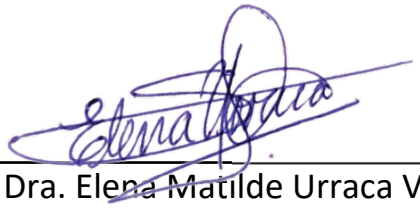
Ing. Dr. Antonio Ricardo Rodríguez Zevallos

Presidente



Ing. Ms. Luis Francisco Márquez Villacorta

SECRETARIO



Ing. Dra. Elena Matilde Urraca Vergara

VOCAL

Ms. Elva Manuela Mejía Delgado

ASESOR

DEDICATORIA

A DIOS

Por ser la luz que hace brillar mi alma, por ser el amigo fiel que me acompaña en los gratos y difíciles momentos de mi vida

Por darme una razón para ser feliz; “Una hermosa profesión”.

Gracias Señor por haberme brindado la fuerza espiritual para seguir adelante y lograr mi mayor anhelo…….

A mi Padre

Cirilo, mi protector, con amor, respeto

Y por depositar su confianza en mí;

Quien, con su comprensión,

Preocupación y sacrificio constante me

brindo la fuerza necesaria para mi

formación personal y profesional.

Gracias por las palabras precias en los

Momentos difíciles y enseñarme cada

Dia a ser mejor

“TE AMO”

A mi Madre

Guadencia, mi admiración

Con amor y gratitud, por sus sabios

Consejos y enseñanzas que me

Ayudaron a forjar mi futuro.

Por ser participe de mis tristezas y

Alegrías en cada paso de mi vida, lo

Cual me ilumina a seguir adelante.

“TE AMO”

A mis queridos hermanos:

Martin, Rosa, Fabiola,

Elsa, Hilda y Carmen

Con mucho cariño por el apoyo

Fraternal, quienes compartieron

Conmigo los momentos más

Importantes y trascendentales de

Mi vida.

“Mis Hermanos, mis queridos

Hermanos”

AGRADECIMIENTO

Mi sincero y profundo

Agradecimiento a mi asesora:

Mg. Elva Mejia

Por su invalorable ayuda y apoyo

Constante en la culminación del

Presente proceso.

Al **Dr. FREDDY PEREZ AZAHUANCHE**,

Por su valiosa contribución en el

Desarrollo de la presente Tesis.

A los miembros del Jurado:

Dr. Antonio Rodríguez Zevallos, Ing. Luis Márquez Villacorta y Msc. Elena Urraca Vergara; por sus sugerencias constructivas.

ÍNDICE GENERAL

CARATULA..... i

APROBACIÓN POR EL JURADO DE TESIS..... ii

DEDICATORIA..... iii

AGRADECIMIENTO..... vi

ÍNDICE GENERAL..... vii

ÍNDICE DE CUADROS..... ix

ÍNDICE DE FIGURAS..... x

RESUMEN..... xi

ABSTRACT..... xii

I. INTRODUCCION 01

II. REVISION DE BIBLIOGRAFIA 04

2.1. EL queso 04

2.1.1. Composición del queso 04

2.2. Queso mantecoso 05

2.2.1. Parámetros de calidad del queso mantecoso 06

2.3. Principales fuentes de contaminación de queso mantecoso 07

2.4. Aceites esenciales 08

2.4.1. Características de los aceites esenciales 08

2.4.2. Localización de los aceites esenciales 09

2.4.3. Clasificación de los aceites esenciales 09

2.4.4. Métodos de obtención del aceite esenciales 11

2.4.4.1. Destilación por arrastre de vapor del aceite esencial 11

2.4.4.2. Otros métodos de obtención del aceite esenciales. 12

2.5. Aceite esencial de orégano (origanum vulgare) 12

2.6. Investigaciones sobre inhibición de microorganismos empleado el aceite esencial de orégano 15

III. MATERIALES Y MÉTODOS 17

3.1. Lugar de ejecución 17
3.2. Materiales 17
3.2.1. Materiales biológicos 17
3.2.2. Materia prima 17
3.2.3. Material de laboratorio 18
3.3. Esquema experimental 18
3.4. Procedimiento experimental 20
3.4.1. Descripción de proceso 21
3.5. Procedimiento para la obtención del aceite esencial de orégano 22
3.6. Método estadístico 24
IV. RESULTADOS 25
V. CONCLUSIONES 29
VI. RECOMENDACIONES 30
VII. BIBLIOGRAFIA 31
VIII. ANEXO 36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición nutricional de queso mantecoso 06

Cuadro 2. Características del aceite esencial de orégano obtenido por el método de destilación por arrastre de vapor 14

Cuadro 3 Composición química del aceite esencial de orégano de acuerdo a cromatograma de gas con detector de masa..... 14

Cuadro 4 Recuerdo de Staphylococcus aureus en queso mantecoso con aceite esencial de orégano. 25

Cuadro 5 **Análisis de varianza del recuento de** Staphylococcus aureus en queso mantecoso con la adición de aceite esencial de orégano..... 26

Cuadro 6. **Prueba Duncan para el recuento de** Staphylococcus aureus en queso mantecoso con la adición de aceite esencial de orégano..... 27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema experimental de la adición de aceite esencial de orégano al queso mantecoso con cepas de S. aureus. 19

Figura 2 Preparación de muestra de queso mantecoso con aceite esencial de orégano y S. aureus 20

Figura 3 Equipo de destilación por arrastre de vapor 23

Figura 4 Diagrama de flujo para extracción de aceite esencial de oregano 24

Figura 5 Formación de colonias de Staphylococcus aureus en queso mantecoso 26

RESUMEN

Se determinó el efecto antibacteriano de la concentración de aceite esencial de orégano (Origanum vulgare) sobre la cepa de Staphylococcus aureus en queso mantecoso.

Para obtener el aceite esencial de orégano, se utilizó el método de destilación por arrastre de vapor. Las muestras de queso mantecoso se tomaron en fracciones iguales de 0.2 g para todas las muestras, como diluyente se utilizó solución salina (9.8 ml) y de la cepa de Staphylococcus aureus se inoculó 0.2 mL a cada muestra.

Las concentraciones del aceite esencial de orégano que fueron adicionadas a las muestras son de 5, 10, 20, 30, 40 y 60%; con excepción de la muestra control.

ABSTRACT

The effect of the concentration of essential oil of oregano (Origanum vulgare) on the strain of Staphylococcus aureus in buttery cheese, was determined.

To obtain the essential oil of oregano, the steam dragging method of distillation was used. The samples of buttery cheese were taken in equal fractions of 0.2 g for all the samples, a saline solution was used as thinner (9.8 ml) and 0.2 ml were inoculate to every sample from the S. aureus strain.

The concentrations of the essential oil of oregano that were added to the samples were: 5, 1 O, 20, 30, 40 and 60%; with exception of the sample control.

With the application of the analysis of variance the statistical significance was determined and with the Duncan test the inhibitory concentration of the essential oil of oregano on the Staphylococcus aureus strain in buttery cheese was determined.

The concentrations of 4% of essential oil of oregano were the most suitable because they entirety disabled the Staphylococcus aureus strain.

I. INTRODUCCION

Las enfermedades transmitidas por alimentos de origen microbiano y parasitario, son causadas por el consumo de agua o alimentos contaminados por microorganismos patógenos, parásitos o sus toxinas. La contaminación de los alimentos puede ser endógena, cuando los microorganismos están presentes en los alimentos, o bien ocurre en algún punto de su elaboración. Por lo tanto, el agente etiológiéo debe estar en los animales, vegetales o medio ambiente en donde se almacena, maneja procesa el alimento (FAO, 2009).

Dentro del amplio grupo de microorganismos patógenos para el hombre, destaca la cepa de Staphylococcus aureus como agente de infecciones y de intoxicaciones alimentarias; pues produce cuadros clínicos debido a la presencia de toxinas preformadas en los alimentos (Fueyo, 2007).

Staphylococcus aureus, es una bacteria conformada por células esféricas que se agrupan formando racimos Gram positivas, inmóviles, que se presentan en forma de racimos irregulares (Cervantes y otros, 2014). Son organismos que utilizan aeróbica y anaeróbicamente la glucosa, lactosa, maltosa y manito! produciendo ácidos. Una característica importante es su tolerancia a la sal y la actividad de agua reducida. Crecen en concentraciones de 5 - 7.5% de cloruro de sodio e incluso algunos hasta en un 20% (Fueyo, 2007). Muchas de las cepas producen coagulasa, sustancia elaborada por las células en crecimiento, con la propiedad de coagular el plasma de conejo o humano (en ausencia de calcio) con la que se le ha relacionado su virulencia (Ricardo y otros, 2015).

El principal hábitat de Staphylococcus aureus es la piel, sus glándulas anexas y las mucosas de lo animales de sangre caliente, especialmente esta asociada al tracto nasal en que se encuentra en 20 - 50% de los

individuos aparentemente sanos y puede llegar posteriormente a los alimentos a partir de los manipuladores siendo estos la principal fuente dé contaminación de Staphylococcus aureus. Cuando llegan a los alimentos y tienen las condiciones adecuadas de tiempo, pH, temperatura, etc. Estas permiten que el Staphylococcus aureus se multiplique y al alcanzar una concentración mayor a 105 microorganismos por gramo se produzca suficiente toxina que origina intoxicación por la enterotoxina estafilocócica (Fuentes y Moreno, 2010).

Los derivados de la leche, y en caso particular los quesos mantecosos, por sus características organolépticas como por sus propiedades nutricionales, constituyen un excelente medio de cultivo para el desarrollo de una gran cantidad de microorganismos patógenos (Herrera, 2014).

Lo anteriormente expuesto pone de manifiesto que en nuestro país no existe un verdadero control de calidad de nuestros productos, las investigaciones citadas detectan el problema de contaminación con cepas de Staphylococcus aureus en los quesos que se comercializan en nuestra región, por lo tanto, las acciones correctivas inmediatas que se deberían tomar es el decomiso de los quesos contaminados por parte de los organismos de control.

La industria alimentaria se enfrenta cada día a nuevos retos, consumidores más exigentes, nuevos hábitos de consumo, siendo la tendencia actual adquirir productos que en lo posible no contengan aditivos químicos, sino aquellos obtenidos de manera natural; la adición de aceite esencial de orégano durante el proceso de elaboración de queso mantecoso, constituye una alternativa viable, ya que se destaca la actividad antibacteriana de éste aceite esencial para reducir y/o eliminar la cepa de Staphylococcus aureus (Fuentes y Moreno, 201 O; Herrera, 2014).

El problema planteado para la presente investigación fue:

¿Cuál es el efecto de la concentración de aceite esencial de orégano (Oríganum vulgare) (5, 10, 20, 30, 40 y 60%) adicionado a queso mantecoso, sobre la cepa de Staphylococcus aureus?

Los objetivos propuestos para esta investigación fueron los siguientes:

- Evaluar el efecto del aceite esencial de orégano sobre la cepa de Staphylococcus aureus en queso mantecoso.
- Determinar la concentración inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre la cepa de Staphy/ococcus aureus en queso mantecoso.

II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

2.1. El queso

La Norma Técnica Peruana 202.193 (lndecopi, 2003) y el Codex Alimentarius STAN A-6 (FAO, 1978), definen al queso como el producto maduro o no, obtenido por coagulación de leche, leche desnatada, reconstituida, suero o cualquier combinación de éstas, bajo áCción del cuajo y/o fermentos lácticos de la leche procesada y/o ácidos orgánicos permitidos.

Los quesos son una forma de conservación de los dos componentes insolubles de la leche: la caseína y la materia grasa, se obtiene por la coagulación de la leche seguida del desuerado, en el curso del cual el lactosuero se separa de la cuajada. El producto puede ser o no fermentado (Ramírez y Vélez, 2012).

Según Guzmán (2009), los quesos se pueden clasificar de la siguiente manera:

a). **De acuerdo a su textura:**

- ✓ Quesos frescos.
- ✓ Quesos de pasta blanda.
- ✓ Quesos de pasta dura.

b). **De acuerdo al contenido de grasa:**

- ✓ Quesos grasos: los de más de 40 % de grasa.
- ✓ Quesos semigrasos: los de 20 - 40 % de grasa.
- ✓ Quesos magros: con menos de 20% de grasa.

2.1.1. Composición del queso.

Guzmán (2009), señala que la caseína es la proteína más importante que aparece en el queso, y deriva de la palabra Caseus, que significa precisamente queso. Otras proteínas como las globulinas y las albúminas escapan en el suero.

El contenido en hidratos de carbono de los quesos está constituido por la lactosa o azúcar de la leche, que acaba transformándose gran parte en ácido láctico por acción de las bacterias lácticas (Ramirez y Vélez, 2012).

En cuanto a las sales minerales, su contenido oscila entre 1.2 y el 4.5%, siendo los más importantes; calcio, fósforo y hierro. En cuanto al contenido en vitaminas, los quesos son más ricos en los solubles en grasa que en los solubles en agua. Por otro lado, cuanto mayor es el contenido graso de un queso mayor es su riqueza en vitaminas A y D (FAO, 2007).

La grasa es, en general, el componente más abundante en los quesos, y durante la maduración se hidroliza en gran parte, contribuyendo al desarrollo de aromas y sabores (Guzmán, 2009).

Según la FAO (2007) el valor nutritivo de los quesos es alto porque:

- ✓ El queso es rico en proteínas de alto valor biológico.
- ✓ El queso proporciona energía calórica para el desarrollo de la vida, debido a su alto contenido en grasa.
- ✓ El queso es una fuente importante de suministro de vitaminas A y D, así como de algunas sales minerales (calcio, fósforo y hierro) indispensables para la vida.

2.2. Queso mantecoso

Tiene como materia prima el quesillo, cuya cuajada se somete a lavado con agua, la finalidad es de eliminar el ácido láctico o suero evitando que el quesillo sea ácido, quedando así sólo el ácido necesario que servirá como preservante para darle el sabor característico del queso mantecoso. Luego es salado, con una proporción de sal de 2.0 a 2.5%, molido, amasado, moldeado y empacado (Herrera, 2014).

El queso mantecoso se caracteriza por ser untuoso, de sabor suave y textura semisólida, que retiene hasta el 50% de agua y el porcentaje de grasa está comprendida entre 30 y 40%. El queso comparte casi las mismas propiedades nutricionales con la leche, excepto porque contiene más grasas y proteínas concentradas. Además de ser fuente proteica de alto valor biológico, se destaca por ser una fuente importante de calcio y fósforo, necesarios para la remineralización ósea (Sánchez y otros, 2014). En el Cuadro 1, se muestra la composición nutricional del queso mantecoso.

Cuadro N° 1. Composición nutricional del queso mantecoso

Componente	Cantidad
Energia (Kcal)	396
Agua (g)	33.5
Proteina (g)	28.0
Grasa (g)	30.0
Carbohidrato (g)	3.30
Cenizas (g)	5.20
Calcio (mg)	1076
Fosforo (mg)	517
Hierro (mg)	1.5
Riboflavina (mg)	0.46
Niacina (mg)	0.09

Fuente: Collazos y otros (1996)

2.2.1. Parámetros de calidad del queso mantecoso

Según Herrera (2014) el queso mantecoso debe cumplir con los siguientes parámetros de calidad:

a). Sensoriales

- ✓ El olor debe ser firme y suave, característico de la leche fermentada con bacterias lácticas.
- ✓ El color, tanto de la parte externa como interna del queso debe ser cremoso.
- ✓ El corte debe ser firme y suave.
- ✓ La textura de este queso debe ser suave y fácil de untar.

b). Fisicoquímicos

- ✓ pH dé 6.5 a 6.8.
- ✓ Humedad, de 30 a 50% aproximadamente.
- ✓ Grasa, alrededor de 55% en base seca.

2.3. Principales fuentes de contaminación de queso mantecoso

Según Fuentes y Moreno (201 O) las principales fuentes de contaminación en el queso se presentan a partir de la leche, del personal, del agua y equipos.

- ✓ El personal de trabajo es la fuente más importante de contaminación. Por lo tanto, se debe controlar el estado de salud del personal y asegurarse de que no sea portador de enfermedades infecciosas.
- ✓ El agua que se emplea para la limpieza y el enjuague del equipo de ordeño o de fabricación, o para el lavado de la cuajada a lo largo de la elaboración del queso.
- ✓ Por medio del equipo: el equipo destinado a la elaboración del queso debe ser fácil de limpiar y desinfectar, evitando contaminaciones microbianas y alteraciones de sabor en el producto final.
- ✓ La leche a lo largo del ordeño, del transporte y del almacenamiento por una gran variedad de microorganismos,

pero tan solo, una parte de estos llegan a multiplicarse; ello dependerá de la temperatura y del medio de cultivo.

2.4. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son productos volátiles de naturaleza compleja, que se encuentran en ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable. Oficialmente, se denomina aceites esenciales los productos que se pueden obtener por arrastre de vapor de agua o por expresión del pericarpio de ciertos frutos. Habitualmente, también se denomina esencias, si bien esta denominación es mucho más amplia, ya que engloban aceites esenciales y a otras sustancias obtenidas por métodos extractivos bastantes diversos (Sánchez, 2012).

2.4.1. Características de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son generalmente líquidos a temperatura ambiente, aunque solidifican a baja temperatura como, por ejemplo, la esencia de anís. Presentan olor penetrante, en general recuerda a la planta de donde proviene, los olores son variables y pueden modificarse por exposición al aire (Aguilar y López, 2013).

Poseen sabor irritante y variable, algunos dulces, otros picantes, cáusticos o ardientes. Son muy refractantes, los índices de refracción son muy elevados, en su mayoría son óptimamente activos y su rotación especifica suele ser un valioso dato para identificarlo (Cerón, 2009).

La mayoría son incoloros cuando están puros y frescos, pero en general son amarillentos y por exposición al aire toman diferentes colores. Son solubles en aceites y grasas, en alcohol, éter, cloroformo, sulfuro de carbono y otros disolventes orgánicos. Algunas esencias son inflamables,

punto de ebullición 150 ºC, pero volatilizan antes de los 100 ºC. Si se dejan en reposo, en un lugar frío, se separan en dos fases; una liquida llamada oleptano constituida de hidrocarburos y la otra sólida llamada estearoptano constituida por productos de oxidación (Agullar y López, 2013).

2.4.2. Localización de los aceites esenciales

Según cerón (2009) los aceites esenciales se encuentran localizados en diferentes órganos vegetales:

- ✓ Raíz, rizomas: cúrcuma, jengibre
- ✓ Fruto: anfs, enebro
- ✓ Corteza: canela
- ✓ Leño: alcanfor
- ✓ Sumidades floridas: menta, lavanda, romero
- ✓ Flores: manzanilla
- ✓ Hojas: eucalipto, orégano, laurel, boldo

Los aceites esenciales se acumulan en cavidades secretoras, en células, en pelos pretores, en canales secretores, etc .

2.4.3. Clasificación de los aceites esenciales

Según Gonzales (2010), los aceites esenciales se pueden clasificar de la siguiente manera:

a). Por su composición elemental

- ✓ Aceites esenciales pobres en oxigeno (ricos en terpeno): trementina, limón, bergamota, romero, orégano, eucalipto, laurel, naranja, etc.
- ✓ Aceite esenciales ricos en oxígeno: anís, comino, menta, manzanilla, rosas, violeta, etc.
- ✓ Aceites esenciales nitrogenados: capuchino, etc.

- ✓ Aceites esenciales sulfonados: ajos, cebolla, mostaza, etc.

b). Por su origen

- ✓ Aceites esenciales naturales: se obtiene directamente de la naturaleza, generalmente son de origen vegetal, aunque puedan tener su origen en el reino animal. Pueden ser productos de secreción como también de algunos estados patológicos.
- ✓ Aceites esenciales sintéticos: son productos de síntesis orgánica, y pueden obtenerse a partir de los compuestos obtenidos de los diversos aceites esenciales, como de compuestos ajenos a estos. Pertenecen a este grupo las yanonas con olor a violeta, que son muy empleadas en perfumería.
- ✓ Aceites esenciales artificiales: son mezclas de los dos anteriores, son de aroma análoga al de los aceites naturales. Se les clasifica en dos sub-grupos:

  a. Los productos extraídos a partir de aceites esenciales; caso geranio!, anetol y mentol.

  b. Los obtenidos por síntesis química; caso de la vainilla, la heliotropina.

2.4.4. Métodos de obtención del aceite esencial

2.4.4.1. Destilación por arrastre de vapor del aceite esencial.

La mayoría de los aceites esenciales son obtenidos por destilación en vapor de agua, que es una técnica para separar materiales volátiles de los no volátiles. En su forma más simple, la mezcla es calentada hasta que las sustancias volátiles ebullen, donde es enfriado y convertido de nuevo en forma líquida. Los aceites esenciales constan de un gran número de componentes, la mayoría de los cuales ebullen entre 150 y 300 ºC. Si ellos son destilados a temperaturas muy altas, muchos de los componentes pueden descomponerse, oxidarse o resinificarse. La destilación con vapor de agua es una forma particular de realizar esta operación, que por ser un proceso más suave, ocasiona pocos cambios drásticos en el aceite esencial (Hernández, 2011) .

Esto es debido a que dos líquidos volátiles, que no son mutuamente solubles ebullen juntos a una temperatura más baja que el punto de ebullición de cada uno aislado. De esta forma cada componente volátil de un aceite esencial puede ser captado por el vapor de agua y la mezcla tener un punto de ebullición ligeramente inferior a 100 ºC (Añanca, 2009) .

2.4.4.2. Otros métodos de obtención del aceite esencial

Existen otros métodos de obtención de aceites esenciales por hidrodestilación (HD), extracción sin solvente de microonda (SFME) y el extracto obtenido por la extracción microonda-asistida (MAE) (Hernández, 2011) .

Separación por centrifugación, se emplea frecuentemente en la industrialización integral de los cítricos (Añanca, 2009).

Presión o expresión, se utiliza cuando el aceite se encuentra en gran cantidad en los frutos, hojas, etc., es decir, en las partes blandas de las plantas (Du y otros, 2009).

Disclusión, se emplea disolvente cuando se trata de obtener aceites muy volátiles; empleándose, por ejemplo, el éter de petróleo, en los que se maceran las plantas, sometiéndose después a una destilación a baja temperatura a presión reducida, con el fin de separar el aceite (Af\anca, 2009).

2.5. Aceite esencial de orégano (Origanum vulgare)

Origanum vulgare (Labiate) "orégano" es cultivado en Tacna (Tarata) en gran escala, cosechado, desecado y distribuido a los mercados nacionales y al exterior. Se utiliza en la preparación de alimentos. Las hojas y sumidades floridas tienen usos en las industrias de licorerías, refresqueras, cosmetológicas y farmacéuticas debido a las propiedades tónicas, amargo-excitantes, antisépticas, diuréticas y antiespasmódicas (Ponce y Millones, 2015). Sobre el poder antiséptico el aceite esencial del orégano, posee efecto

antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas como Staphylococcus aureus y Bacillus cereus y sobre bacterias Gram negativas a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1.56%, gracias a que contiene limonene, y-cariofilene, p-cymenene, alcanfor, linalol, a-pinene, carvacrol y timol (Vásquez y otros, 2014) .

Las características de un aceite esencial de Origanum vulgare son dadas en forma general mediante valores de índice de refracción, gravedad específica, rotación específica, rango de temperatura de ebullición, punto de cristalización o congelación, índice de acidez, índice de éster y más específicamente, cuando se conoce, en base a los componentes principales o principio activo propio, como en este caso es el contenido de fenoles que contiene principalmente al timol y carvacrol (García y García, 2008).

El carvacrol es el componente de mayor valor y existe variación en los porcentajes de éste, debido principalmente a los diferentes tipos de suelo en donde se produce y aprovecha el orégano (García y García, 2008).

En el Cuadro 2 se muestra las condiciones, rendimientos, propiedades y constantes físicas del aceite esencial de orégano obtenido por destilación con arrastre de vapor de agua.

Cuadro 2. Características del aceite esencial de orégano obtenido Por el método de destilación por arrastre de vapor

Características	Aceite esencial de orégano
Tiempo de destilacion	30 minutos
Volumen de destilacion	60 mL
Rendimiento	1.3 mL
Densidad especifica 20 °C	0.92324
Índice de refracción	1.4774

Fuente: Amadio y Otros (2011)

Cuadro 3. se detalla la composición química del aceite esencial de orégano analizada mediante la técnica de cromatograma de gas con detector de masa (Amadio y otros, 2011).

Compuesto	Cantidad (%)
Trans-sabrineno hidratado	3.53
Linalol	1.47
Cis-sabineno hidratado	18.66
4-terpineol	9.43
Terpineol	2.76
Acetato de linalilo	7.40
Timil metil éter	2.07
Carvacrol	7.72
Trans-Cariofileno	2.76
Spathulenol	2.26
Oxido de cariofileno	2.21
Acido palenético	8.39

Acido 9, 12-octadecadienoico	8.29
9, 12, 15-octadecatrienal	5.08
2-metilhexanal	1.74
2-dodecanona	2.52

Fuente: Amadio y Otros (2011)

2.6. Investigaciones sobre inhibición de microorganismo empleando el aceite esencial de orégano

Los aceites extraídos de diferentes plantas aromáticas poseen actividades antifúngicas, insecticidas y antimicrobianas. El uso de estos compuestos antimicrobianos naturales es de suma importancia en la conservación de alimentos y en el control de enfermedades de origen microbiano en humanos, animales y vegetales. Hoy en día existen un creciente interés en sustituir conservantes químicos alimentarios por conservantes naturales debido a la alta toxicidad de los primeros, teniendo ambos tipos propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Los aceites esenciales de determinadas plantas aromáticas pueden ser utilizados como conservantes naturales, prolongando el período de almacenamiento de los productos alirnenticios (Vásquez y otros, 2014).

Llerena (2002) trabajó con 76 muestras de queso, de la ciudad de Trujillo correspondiendo: 25 procedentes del mercado Central, 26 del Mayorista, 14 del Unión y 11 de la Noria. Encontrando una frecuencia de S. aureus coagulasa positivo, en 80.26% del total de muestras procesadas. Además determinó que en el mercado la Unión hubo rnayor frecuencia de quesos contarninados y en el mercado la Noria encontró menor frecuencia.

Ortega (2001), investigó la presencia de S. aureus coagulasa positivo en 160 muestras de queso frescos, adquiridos en el Terminal Sanitario de Zela de la ciudad de Trujillo. Determinando la presencia de S. aureus coagulasa positivo en 103 muestras de queso fresco correspondiente al 64.4% del total de muestras analizadas.

Mora y otros (2005), al evaluar la reducción in vitro producida por extractos de aceites esenciales de ajo, albahaca, orégano, romero, tomillo y zacate limón, frente a Listeria monocytogenes, Sa/monella typhimurium, Staphy/ococcus aureus, Escherichia coli y Shigella spp., con concentraciones de 0.05 a 4%, hasta determinar el rango óptimo que permitió observar la reducción y estimar la concentración mínima inhibitoria (CMI), encontraron que los extractos más efectivos de los seis probados en la reducción in vitro fueron el orégano (1- 2%) y el tomillo (2 - 7%). La bacteria que presentó mayor sensibilidad a los aceites esenciales fue S. aureus, mientras que S. spp., fue la más resistente a los tratamientos.

Morillas (2015) evaluó el efecto antimicrobiano in vitro de cuatro concentraciones de aceite de Origanum vulgare (orégano) frente a Salmonella typhi, donde observó que el aceite etanólico de Origanum vulgare (orégano) tuvo efecto inhibitorio in vitro frente a Salmonella typhi al comparar los halos de inhibición según escala de Duraffourd para las 4 concentraciones utilizadas obteniendo valores por encima de 20 mm con O UFC, teniendo como CMI 25%; además se observó que hubo una diferencia dosis dependiente debido a que los grupos mostraron tener diferencia estadística no significativa ($p<0,05$). Comprobándose tener una eficacia del 100% sobre esta medida de la cepa frente al aceite etanólico de Origanum vulgare .

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de Ejecución

El presente estudio se realizó en el laboratorio de la sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo y en el laboratorio de Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Privada Antenor Orrego.

3.2. Material.

3.2.1. Material Biológico

3.2.1.1. Material Botánico

Para la obtención de aceite esencial, se utilizó el orégano seco (Origanum vulgare), procedente del departamento de Tacna.

3.2.1.2. Cepas Bacterianas

Se empleó la cepa de Staphy/ococcus aureus: ATTC 25923, que fue proporcionada por el departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de Trujillo .

3.2.1.3. Materia Prima

Se empleó queso mantecoso proveniente de la Fábrica de Alimentos "Hualgayoc" en la ciudad de Cajamarca. Registro Sanitario A4202307N EGSAHY.

3.2.2. Material de Laboratorio

3.2.2.1. Equipo de laboratorio

- Balanza analítica. Marca Mettler Toledo, capacidad 210 g, precisión 0.0001g.
- Cocina eléctrica. Marca GoldStar.
- Equipos de destilación por arrastre de vapor. Estufa. MEMMERT. Rango 30-200 ºC, sensibilidad 1 ºC.

- Autoclave
- Licuadora. Marca lmaco, Mod. BL9S. 220V - 60Hz 500W.
- Cámara contadora de colonias. Marca Quebec.

3.2.2.2. Solvente

- Agua destilada.
- Solución salina 0.95% (Cloruro de Sodio).

3.2.2.3. Medios de Cultivo

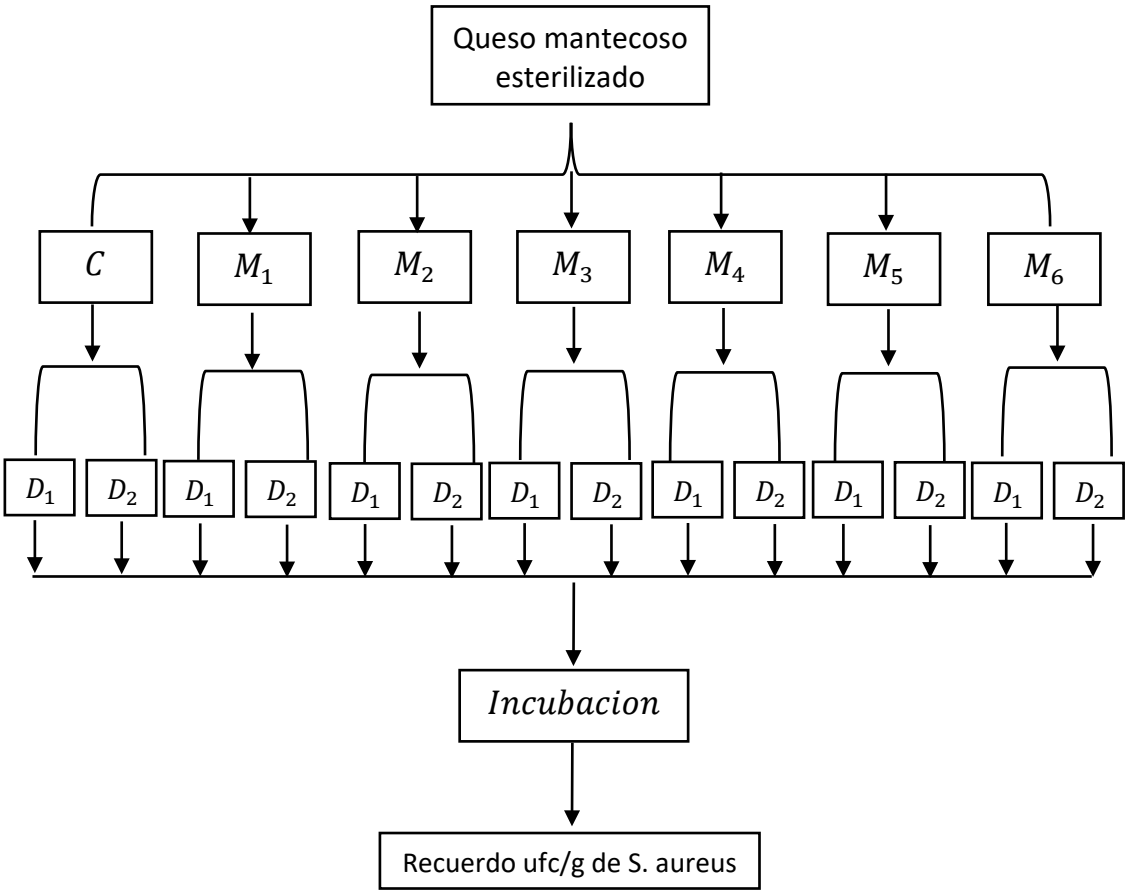
- Agar Soya Tripticasa (TSA)
- Agar Manitol Salado

3.2.2.4. Materiales

- Tubos de ensayo
- Placas estandarizadas
- Pipetas de 1 O mL
- Matraz Erlenmeyer de 1000 mL
- Embudo de decantación
- Algodón
- Alcohol
- Asa bacteriológica
- Asa de Driglasky
- Mechero
- Jeringas descartables de 5 mL

3.3. Esquema experimental

El esquema experimental de la investigación tuvo como variable independiente la concentración del aceite esencial de orégano (Origanum vulgare) y como variable dependiente el recuento de la cepa de S. aureus, como se muestra en la Figura 1 .



C : muestra control 0.2 g de queso mantecoso, 9.8 mL de solución salina y 0.2 mL de S. aureus

M_1 : muestra 1 queso mantecoso, solución salina S. aureus y 0.05 mL de aceite de orégano

M_2 : muestra 2 queso mantecoso, solución salina S. aureus y 0.1 mL de aceite de orégano

M_3 : muestra 3 queso mantecoso, solución salina S. aureus y 0.2 mL de aceite de orégano

M_4 : muestra 4 queso mantecoso, solución salina S. aureus y 0.3 mL de aceite de orégano

M_3 : muestra 5 queso mantecoso, solución salina S. aureus y 0.4 mL de aceite de orégano

M_4 : muestra 6 queso mantecoso, solución salina S. aureus y 0.6 mL de aceite de orégano

D_1 : Dilución 10^{-1}

D_2 : Dilución 10^{-2}

Figura 1. Esquema experimental de la adición de aceite esencial de orégano en queso mantecoso con Staphylococcus aureus

3.4. Procedimiento experimental

En la figura 2 se muestra el procedimiento de preparación de muestras para la parte experimental.

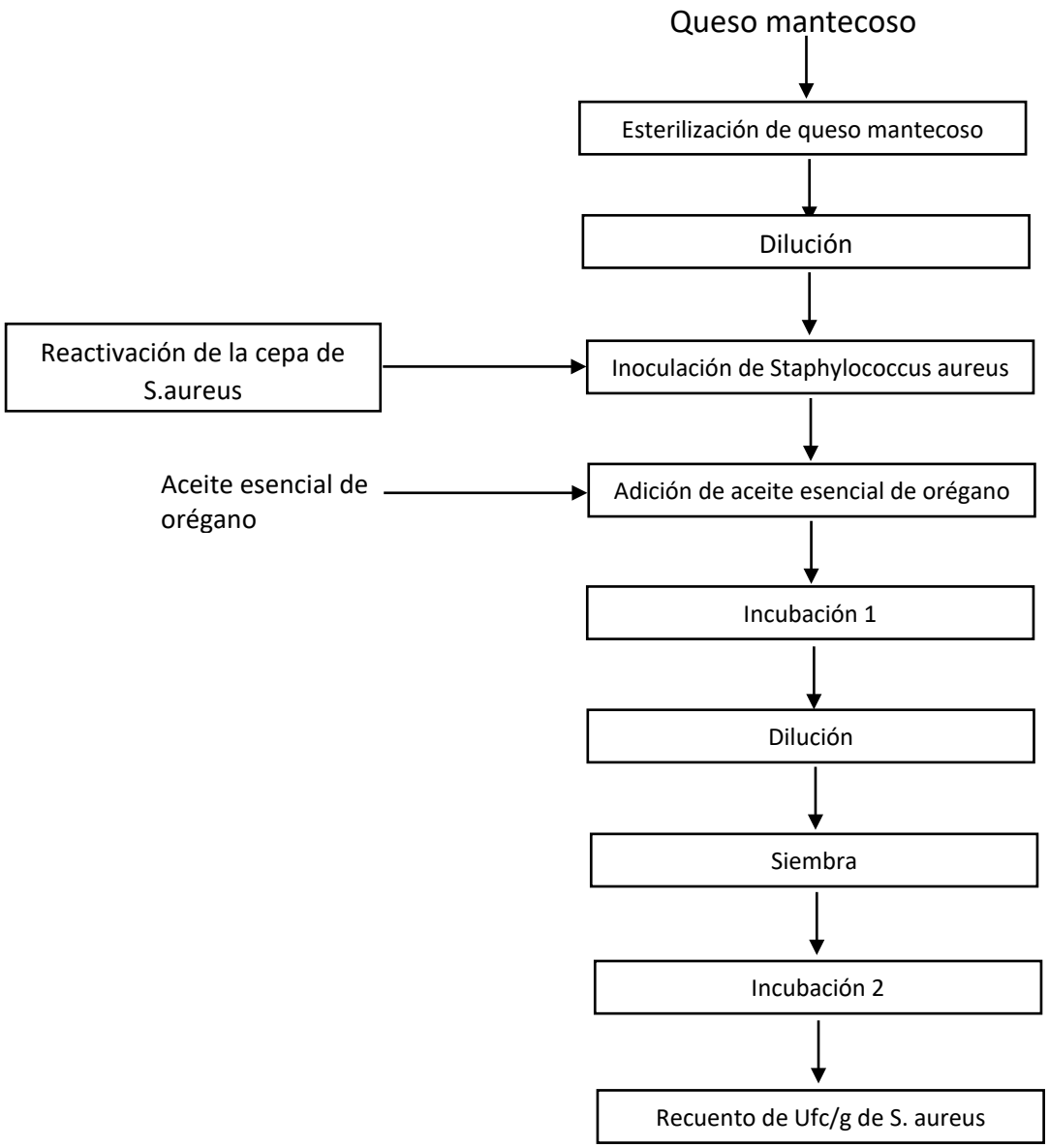


Figura 2. Preparación de muestras de queso mantecoso con aceite esencial de orégano y Staphlococcus aureus

3.4.1. Descripción de proceso

- **Esterilización del queso mantecoso**

Se partió de un queso mantecoso ya elaborado el cual fue comprado en puntos de venta que garantizan su calidad. El queso mantecoso fue envasado y cerrado herméticamente en una lata metálica, luego se realizó una esterilización en un autoclave mediante la acción de vapor directo a una temperatura de 115 ºC durante un período de tiempo de 15 min, según lo recomendado por Herrera (2014).

- **Dilución de la muestra de queso**

Se tomó fracciones iguales de queso mantecoso (0.2 g) y solución salina (9.8 ml) en todas las muestras presentes, en tubos de ensayo, luego se procedió a homogenizar manualmente mediante agitación.

- **Reactivación de la cepa de Staphylococcu. aureu.**

la cepa de Staphy/ococcus aureus, la cual se mantiene a una temperatura de 8 ºC, se reactivó en un medio de Agar Soya Tripticasa (TSA), en un tubo de ensayo empleando una asa bacteriológica, luego se incubó a 37 ºC por 24 h.

- **Inoculación de la cepa de Staphy/ococcus aureus al queso mantecoso**

Se adicionó 0.2 ml de la cepa reactivada, con una jeringa descartable a los tubos de ensayo los cuales contenían queso mantecoso y solución salina.

- **Adición de aceite esencial de orégano**

Se adicionó diferentes concentraciones del aceite esencial con una jeringa descartable: 0.05 mUg, 0.1 mUg, 0.2 mUg, 0.3 mL/g, 0.4 mL/g y 0.6 mL/g excepto a la muestra control.

- **Incubación 1**

Todas las muestras se incubaron a 37 ºC por 24 h.

- **Realización de diluciones**

Se realizaron diluciones de 10-1 y 10-2 en tubos de ensayo a cada una de las muestras procesadas, empleando solución salina (0.9 ml) luego se homogenizaron manualmente mediante agitación.

- **Siembra en placa**

De las diluciones 10-1 y 10-2 de todas las muestras se adicionó 0.1 ml en cada placa con Agar Manito! Salado (con tres repeticiones cada dilución); luego se procedió a extender en todas las direcciones con ayuda de la espátula Driglasky previamente esterilizada, hasta dispersar completamente la muestra en toda el área de la placa.

- **Incubación 2**

Se incubaron las placas en posición invertida, a la temperatura de 37 ºC por 24 h.

- **Recuento de Staphylococcus aureus ufc/g (unidades formadoras de colonias/g) en las muestras**

Tras el periodo de incubación se examinaron las placas. Se determinaron el número de colonias mediante el método del conteo, utilizando una cámara contadora de colonias (Pajuelo, 2015).

3.5. Procedimiento para la obtención del aceite esencial de orégano

Del orégano seco se seleccionaron las hojas, posteriormente éstas se pesaron y finalmente se molieron hasta obtener orégano en polvo. Luego se procedió a colocar el orégano (60 g} en un balón de tres bocas, se calentó el agua destilada (900 ml) en un Matraz Erlenmeyer de capacidad de 1000 ml, una vez que se haya terminado de evaporar

esta cantidad de agua se adicionó 900 ml para una misma muestra de 60 g de orégano. Se inicio el proceso de destilación y el desprendimiento de vapor arrastró el aceite esencial de la planta el cual pasó a través del refrigerante, se recolectó en un embudo de decantación y finalmente se separó del agua por diferencia de densidades.

El aceite esencial de orégano obtenido fue colocado en frascos herméticos y almacenados a temperatura de refrigeración.

En la Figura 3**.** se muestra el equipo de destilación por arrastre de vapor para obtener el aceite esencial de orégano.

Figura 3. Equipo de destilación por arrastre de vapor

En la Figura 4, se presenta el diagrama de flujo para extracción de aceite esencial de orégano

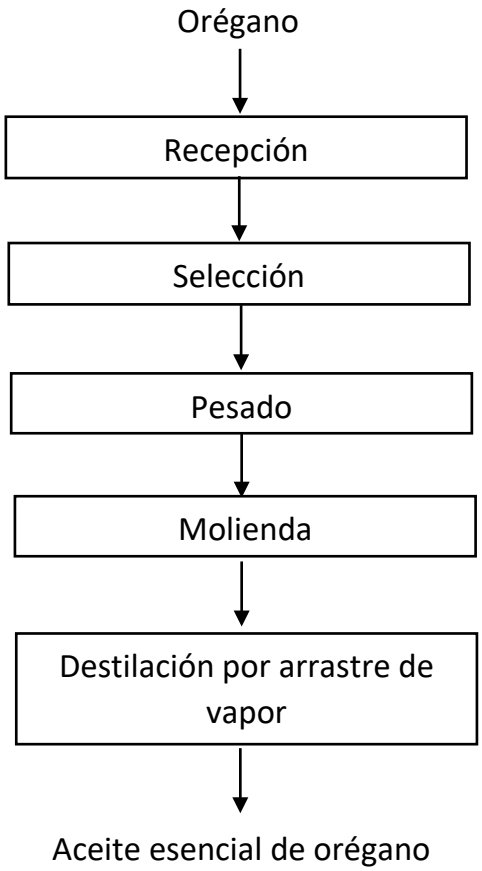


Figura 4. Diagrama de flujo para extracción de aceite esencial de orégano.

3.6. Metodología estadística

Para el recuento de las ufc/g de Staphylococcus aureus en queso mantecoso se trabajó con un diseño completamente al azar con siete niveles y con tres repeticiones, para lo cual se utilizó un análisis de varianza, seguido de la prueba Duncan, a un nivel de confianza del 95%. Para el proceso estadístico se utilizó el programa SPSS Versión 15.0.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Recuentro de Staphylococcus aureus en queso mantecoso

Los promedios de las ufc/g de Staphylococcus aureus en función del contenido de aceite esencial de orégano se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Recuentro de **Staphylococcus aureus** en queso mantecoso con aceite de orégano

Muestras		Concentración de aceite esencial (%)	**Staphylococcus aureus**
Control		0	1.84×10^8
Experimental	M_1	5	1.83×10^8
	M_2	10	2.38×10^6
	M_3	20	1.93×10^3
	M_4	30	2.31×10^2
	M_5	40	0
	M_6	60	0

La concentración inhibitoria de aceite esencial de orégano fue de 40 y 60% correspondiente a los tratamientos Ms y Ms, en la que se determinó la inhibición del crecimiento de Staphylococcus aureus (Cuadro 4), en cambio en la muestra control se observó un crecimiento alto de Staphylococcus aureus, ya que en esta no se adicionó aceite esencial de orégano; la muestra M1, M2, M3 y M4 tuvieron crecimiento menores que en el control. Cada muestra tuvo 3 repeticiones. Los resultados experimentales se encuentran en el Anexo 1.

En la Figura 5 se muestran los cultivos realizados para determinar el recuerdo de Staphylococcus aureus.

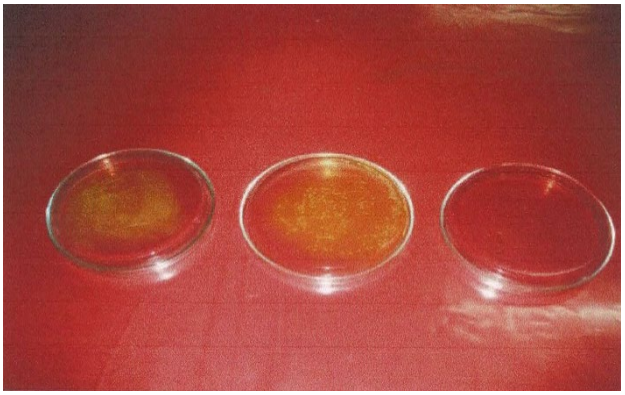


Figura 5. Formación de colonias de Staphylococcus aureus en queso mantecoso

En el Cuadro 5, se presenta el análisis de varianza para el recuento de Staphylococcus aureus en queso mantecoso con la adición de aceite esencial de orégano.

Cuadro 5. Análisis de varianza para el recuento de Staphylococcus aureus en queso mantecoso con la adición de aceite esencial de orégano

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Concentración de aceite esencial	1.43E+17	6	2.384E+16	2.50E+04	0.000
Error	1.33E+13	14	9.524E+11		
Total	1.43E+17	20			

El análisis de varianza muestra que la concentración de aceite esencial de orégano presentó efecto significativo ($p<0.05$) sobre el recuento de Staphy/ococcus aureus en queso mantecoso.

En el Cuadro 6, se muestra la prueba de Duncan para el recuento de Staphy/ococcus aureus en queso mantecoso con la adición de aceite esencial de

orégano. Donde se tiene en el subgrupo 1 a los tratamientos que presentaron menor recuento, correspondientes a la adición de aceite esencial de orégano en queso mantecoso al 20, 30, 40 y 60%, con recuento de Staphylococcus aureus de 1.93x103, 2.31x102, O y O ufc/g, respectivamente (estadísticamente iguales al estar en el mismo subgrupo), además, en el subgrupo 3 los tratamientos con 5% y control presentaron los valores más altos con 1.83x108 y 1.84x108 ufc/g .

Cuadro 6. Prueba de Cunean para el recuento de Staphylococcus aun,us en queso mantecoso con la adición de aceite esencial de orégano.

Condentracion de aceite sencial de oreano (%)	**Subgrupo**		
	1	**2**	**3**
40	0.00		
60	0.00		
30	$2.31x10^2$		
20	$2.31x10^3$		
10		$2.31x10^6$	
5			$1.83x10^8$
0			$1.84x10^8$

La norma sanitaria que establece criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo humano, promulgada con Resolución Ministerial Nº 5868-2008/DG/DIGESA (DIGESA, 2008) establece los limites máximos permisibles de 1.0x102 ufc/g de Staphy/ococcus aureus en queso mantecoso, en esta investigación con la concentración de aceite esencial de orégano al 40% el recuento fue menor (O ufc/g) al requerido por esta norma, siendo esta la concentración mínima inhibitoria.

El modo por el cual los microorganismos son inhibidos por los aceites esenciales y sus compuestos químicos parece implicar diferentes mecanismos, esto se

debe a la acción de los compuestos fenólicos, los cuales sensibilizan a la bicapa de fosfolípidos de la membrana citoplasmática microbiana causando aumento de la permeabilidad, la falta de disponibilidad de los componentes intracelulares vitales y/o deterioro de los sistemas de enzimas bacterianas (Du y otros, 2009; Herrera, 2014).

Vásquez y otros (2014) evaluaron el efecto del aceite esencial de orégano (Origanum vulgare) en la supervivencia de Staphylococcus aureus en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada, donde la concentración mínima inhibitoria fue de 1.5%. La medición del crecimiento microbiano se realizó mediante la técnica de recuento en placa en Agar Müler Hinton.

Castillo (201 O) evalúo las características microbiológicas (bacterias mesófilas) y sensoriales de un queso fresco adicionando aceite esencial de romero al 0.025% y romero en polvo al 0.2% en la cuajada además de un queso testigo, estos se almacenaron en refrigeracidn a 4 ºC durante 20 días. Determinó que el contenido de bacterias se vio inhibido en mayor medida por el aceite esencial de romero seguido del romero en polvo.

Investigaciones similares demuestran la acción antibacteriana del aceite esencial de orégano frente a la cepa de Stapf ylococcus aureus, diferenciándose en los métodos utilizados para las evaluaciones de la actividad antimicrobiana de los aceites esentiales, variaciones metodológicas y de materiales empleados, así como la técnica de valoración, medio de crecimiento, microorganismos empleados y la composición de los aceites esenciales .

V. CONCLUSIONES

El aceite esencial de orégano denota un efecto significativo como bactericida sobre la cepa de Staphy/ococcus aureus en queso mantecoso.

La concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de orégano sobre la cepa de Staphylococcus aureus fue de 40%.

VI. RECOMENDACIONES

Para una mejor extracción de aceite esencial de orégano mediante el proceso de arrastre con vapor de agua seria conveniente trabajar con orégano desecado el cual debe estar molido para romper sus células y de esa manera facilitar la extracción del aceite que contiene la planta.

Los aditivos naturales constituyen una alternativa dentro de una política de salud; para resolver problemas que acarrean los aditivos de síntesis química que actualmente se utilizan. Siendo recomendable el uso de aceite esencial de orégano a concentraciones 40 y 60% para queso mantecoso.

Sería conveniente realizar estudios de la acción de aceite esenciales en otros tipos de quesos como: arenoso, queso fresco y tipo suizo.

VII. BIBLIOGRAFIA

Amadio, C., Medina, R., Dediol, C., Zimmermann, M. y Miralles, S. 2011. Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. FCA Uncuyo, 43: 237 - 245.

Añanca, E. 2009. Efecto antimicrobiano in vitro del extracto acuoso de vainas de Caesalpiniaspinosa (Tara) en cepas de Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico. Universidad Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú.

Castillo, R. 201 O. Evaluación de la capacidad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial y del polvo de romero (Rosmarinus officinalis L.) en queso fresco de vaca. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de las Américas. Puebla, México.

Cervantes, E., García, R. y Salazar, P. 2014. Características generales del Staphylococcus aureus. Patología clínica, 61: 28 - 40.

Collazos, C., Alvistur, E., Vásquez, J., Quiroz, A. y Herrera, N. 1996. Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. Ministerio de Salud. Lima, Perú.

DIGESA. 2008. norma sanitaria que establece criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo humano. Dirección General de Salud. Lima, Perú.

Du, W., Olsen, C., Avena, R., McHugh, T., Levin, C. y Friedman, M. 2009. Effects of allspice, cinnamon and clove bud essential oils in edible apple films on physical properties and antimicrobial activities. Journal of Food Science, 74(7): 372 - 378 .

FAO. 1978. Codex Alimentarius STAN A-6: norma general para el queso.

FAO. 2007. Leche y productos lácteos. Informe técnico. Roma, Italia.

FAO. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Informe técnico sobre ingenierla agrícola alimentaria. Roma, Italia.

Fuentes, S. y Moreno, E. 201 O. Identificación de riesgos biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social. Bogotá, Colombia.

Fueyo, J. 2007. Frecuencia de tipos de toxinas superantígenos en Staphylococcus aureus de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biología Funcional. Universidad de Oviedo. Oviedo, España.

García, R. y García, E. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 2: 41 - 51.

Guzmán, L. 2009. Maduración acelerada de quesos. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro. Saltillo, México.

Herrera, J. 2014. Efecto de la proporción de Thymus vulgaris L. (tomillo) deshidratado y tiempo de almacenamiento sobre las características microbiológicas (Staphylococcus aureus, coliformes totales y Listeria monocytogenes) y aceptabilidad general de un queso mantecoso especiado. Tesis para obtener el titulo de Ingeniero Agroindustrial. Universidad César Vallejo. Trujillo, Perú.

lndecopi. 2003. Norma Técnica Peruana 202.193: Leche y productos lácteos. Queso. Identificación, clasificación y requisitos. Lima, Perú.

Llerena, E. 2002. Staphylococcus aureus coagulasa positivo en quesos de los mercados Central, Mayorista, Unión y la Noria de la Ciudad de Trujillo: Tesis para obtener el título de Biólogo-Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.

Mora, L., Ramírez, E., Gutiérrez, R., Raygoza, J. y Arguijo, R. 2005 . Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de extractos de aceites esenciales frente a Sa/monella Typhimurium, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Sthaphylococcus aureus y Shigella spp. Inocuidad Alimentaria, 2: 101 -109.

Morillas, l. 2015. Efecto in vitro del aceite de Origanum vulgare sobre Salmonella Typhi. Tesis para obtener el titulo de Médico Cirujano .. Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, Perú.

Ortega, Z. 2001. Presencia de Staphylococcus aureus Coagulasa positivo en muestras de queso fresco. Tesis para obtener el titulo profesional de Biólogo-Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú..

Pajuelo, S. 2015. Efecto antibacteriano del hipoclorito de sodio al 2.5% a cambios de temperatura ante el enteroccocus faecalis A TCC29212 in vitro. Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista. Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, Perú.

Ponce, A. y Millones, P. 2015. Efectividad antibacteriana de productos naturales frente a microrganismos patógenos de la flora oral. Ciencias de la Salud, 2(2): 530 - 537.

Ramírez, C. y Vélez, J. 2012. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 6(2): 131-148.

Ricardo, D., Buelvas, F., Escobar, J. y Tovar, C. 2015. Colonización y factores de virulencia de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en una población infantil de Montería. latreia, 28(3): 259 - 268.

Sánchez, J., Arana, L., Cortijo, P., Haro, R., Olivares, l., Pérez, M. y Polo, K. 2014. Estudio de la transferencia de masa en la operación de lavado del quesillo para la elaboración del queso mantecoso. Agroindustrial Science, 4: 42 - 51.

Vásquez, M., Alvarado, P., Rodríguez, l., Saldaña, W., Reyes, W. y Vargas, A. 2014. Efecto del aceite esencial de Origanum vulgare en la supervivencia de Staphylococcus aureus, Salmonella thypi, Salmonella parathypi y Salmonella enteritidis en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. Rebiol, 34: 57 - 68.

VIII. ANEXO

Anexo 1. Recuento de Staphylococcus aureus en muestras de queso mantecoso tratadas con aceite esencial de orégano.

Muestras		Concentración de aceite esencial	Resultados
Control		0	$1.83x10^8$
			$1.82x10^8$
			$1.86x10^8$
Experimental	M^1	0.05	$1.83x10^8$
			$1.84x10^8$
			$1.81x10^8$
	M^2	0.1	$2.36x10^6$
			$2.38x10^6$
			$2.39x10^6$
	M^3	0.2	$1.92x10^3$
			$1.93x10^3$
			$1.94x10^3$
	M^4	0.3	$2.30x10^2$
			$2.30x10^2$
			$2.32x10^2$
	M^5	0.4	0
			0
			0
	M^6	0.6	0
			0
			0